

DNA *BARCODE* DAN ANALISIS FILOGENETIK MOLEKULER BEBERAPA JENIS BIVALVIA ASAL PERAIRAN SULAWESI UTARA BERDASARKAN GEN *COI*

(The *DNA Barcode* and molecular phylogenetic analysis several Bivalve species from North Sulawesi Waters based on *COI* gene)

Monalisa Tindi^{1*}, N. Gustaf F. Mamangkey¹, Stenly Wullur¹.

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado

*email : monalisa.tindi@yahoo.com

The identification of Bivalves commonly based on their morphological characteristic, this methods is very problematic due to several specimens share similarity on morphology and colours. This study was using DNA *barcodes* as a molecular identification tool. Despite the Indo-Malay Archipelago hosts the world's greatest diversity of marine species, studies on the genetic structure and phylogenetic of marine organisms within this area are very rare especially in North Sulawesi. The aim of this study was to detect DNA composition of *COI* gene and also to explore the feasibility of using it as a molecular marker and species identification on pearl oysters. The bivalve *COI* sequences were amplified using PCR and the molecular phylogenetic analysis was using Neighbor Joining Method. These results indicate that the specimen KM 10 were collected from Arakan Bay is *Atrina vexillum* species since the similarity level reach 99% from NCBI database. This sequence consist 63 mutation sites, 26 insertion sites, 36 deletion sites and 1 transversion site. The amplified DNA fragments were about 681 bp, including the partial sequences of LCO1490 and HCO2198 primers. The *Atrina vexillum* specimen from North Sulawesi shows polyphyletic to *Atrina vexillum* species collected from China and Japan. In addition, this study also provides molecular information which is useful for the pearl oyster hatchery industry.

Keywords: Bivalves, Pearl oysters, DNA *Barcode*, *COI*, Molecular phylogenetic, *Atrina vexillum*, North Sulawesi

Identifikasi Bivalvia hanya berdasarkan karakter morfologi sangat rentan terhadap kesalahan identifikasi karena adanya persamaan bentuk dan warna. Studi ini menggunakan DNA *barcode* sebagai alat untuk identifikasi molekuler spesies. Meskipun kepulauan Indo-Malay merupakan diversitas terbesar dari spesies laut, studi mengenai struktur genetik dan filogenetik dari organisme laut dalam daerah ini masih jarang terutama di Sulawesi Utara. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan komposisi DNA dari gen *COI* dan juga untuk mengeksklore kemungkinan dari penggunaan penanda molekuler untuk analisis filogenetik dan identifikasi spesies kerang mutiara. Sekuens *COI* bivalvia di amplifikasi menggunakan PCR dan untuk analisis filogenetik molekuler menggunakan metode Neighbor joining. Hasil menunjukkan bahwa specimen KM 10 yang dikoleksi dari pantai Arakan merupakan spesies *Atrina vexillum* karena memiliki tingkat kemiripan dari Bank gen NCBI sebesar 99%. Terdapat 63 situs mutasi yang terdiri dari 26 situs insersi, 36 situs delesi dan 1 situs transversi. Fragment hasil amplifikasi sebesar 681bp, perputaran antara setengah sekuens dari primer *COI* yaitu LCO1490 dan HCO2198. *Atrina vexillum* yang berasal dari Sulawesi Utara merupakan polifiletik dengan spesies *Atrina vexillum* dari China dan Jepang. Sebagai tambahan, penelitian ini juga menyediakan informasi berharga mengenai studi biologi molekuler yang digunakan sebagai informasi dalam industry budidaya dari kerang mutiara.

Kata kunci: Bivalvia, Kerang mutiara, DNA *Barcode*, *COI*, Filogenetik molekuler, *Atrina vexillum*, Sulawesi Utara

PENDAHULUAN

Teknik DNA *barcode* merupakan sistem yang dirancang untuk melakukan identifikasi secara cepat dan akurat berdasarkan urutan basa nukleotida dari gen penanda pendek yang telah terstandarisasi yaitu gen *Cytochrome Oxidase Subunit I (COI)*. Gen *COI* (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) merupakan salah satu gen penyandi dalam genom mtDNA yang dikenal memiliki banyak kelebihan salah satunya yakni gen *COI* sedikit sekali mengalami delesi dan insersi pada sekuennya serta banyak bagian yang bersifat *conserve* (lestari) sehingga dapat digunakan sebagai DNA *barcode*, yaitu penciri setiap spesies (Hebert *et al.* 2003).

Filogenetik molekuler telah menjadi bagian dari bermacam-macam jenis penelitian dari biologi molekuler, populasi genetik, perkembangan biologi dan biologi evolusioner (Kumar dan Filipinski 2001). Filogenetik molekuler merupakan suatu metode yang sering digunakan hampir disemua cabang biologi untuk perbandingan genom dan untuk mengetahui hubungan antar spesies berdasarkan pohon kehidupan melalui perhitungan statistika urutan basa (Yang dan Rannala 2012).

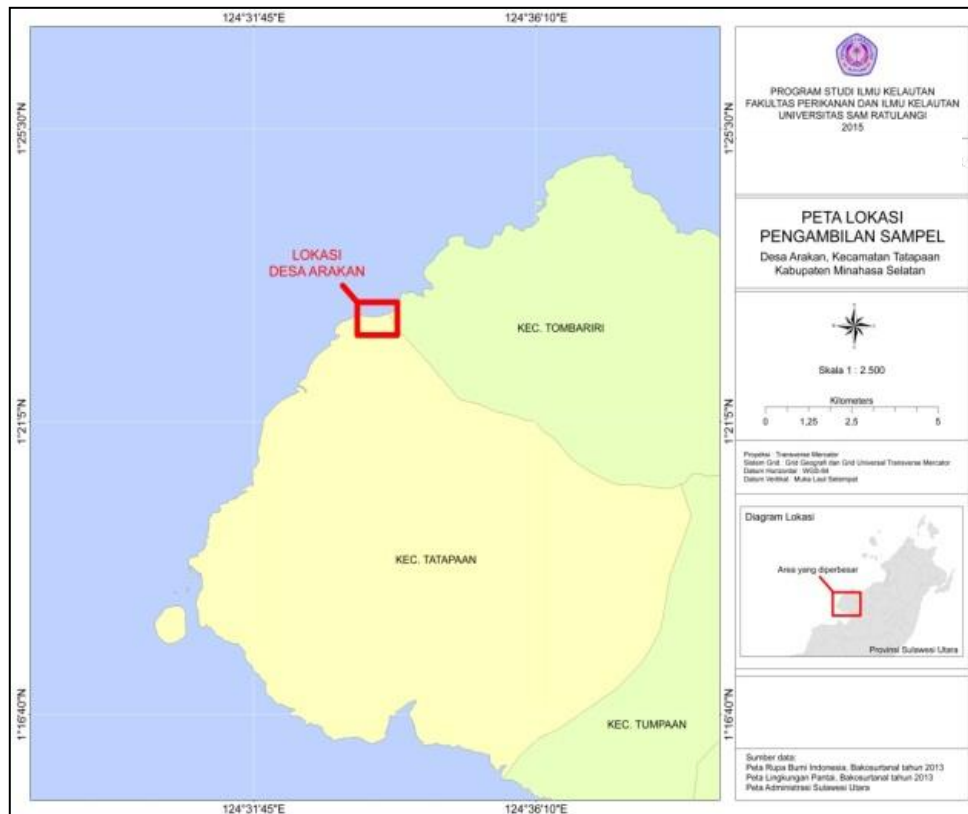
Kerang mutiara ditemukan hidup diperairan Sulawesi Utaranamun terdapat spesies kerang mutiara yang tidak dapat diidentifikasi secara fenotip. Teknik identifikasi berdasarkan karakteristik morfologi rentan terhadap kesalahan identifikasi akibat adanya fenomena *cryptic species* dan *complex species*. Maka diperlukan penelitian identifikasi secara genotip untuk mengetahui nama spesies, mengetahui struktur materi genetik maupun

hubungan kekerabatan dan jarak genetik antar spesies kerang mutiara.

Penelitian, pengembangan serta pemanfaatan kerang mutiara dalam bidang molekuler belum banyak dilakukan di Indonesia sehingga diperlukan identifikasi spesies secara molekuler yang merupakan tahap awal yang penting dalam upaya pengembangan dan pengelolaan kekayaan sumberdaya hayati, terutama diperairan Sulawesi Utara yang terdapat spesies kerang mutiara yang belum diketahui nama spesiesnya atau belum teridentifikasi. Taksonomi dari kerang mutiara biasanya dilakukan hanya berdasarkan ciri-ciri cangkang (bentuk dan warna) yangmana secara garis besar dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan *heterogeneity* diantara habitat (McCully 2013). Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan karakter nukleotida gen *COI* kerang mutiara, mengidentifikasi spesies kerang mutiara serta merekonstruksi pohon filogenetik molekuler kerang mutiara.

METODE PENELITIAN

Koleksi specimen kerang mutiara dilakukan di Arakan Kecamatan Tatapaan Kabupaten Minahasa Selatan (Gambar 1). Penelitian dilakukan pada tahun 2015. Koleksi specimen dalam penelitian ini dilakukan dengan cara memotong bagian kaki kerang mutiara menggunakan pisau bedah. Kemudian specimen kerang mutiara dimasukkan kedalam tabung mikro sentrifugasi 1,5 ml dan diisi ethanol 100% sebanyak 1 ml dan diberi label. Specimen kerang mutiara kemudian dibawa ke Laboratorium Biologi molekuler dan farmasitika kelautan FPIK Unsrat untuk di Ekstraksi dan amplifikasi PCR.



Gambar 1. Peta lokasi penelitian

Komponen utama dalam PCR yaitu DNA template, dNTPs, buffer PCR, $MgCl_2$, primer, dan enzim polymerase. Primer yang digunakan yaitu primer universal rancangan dari Folmer *et al.* (1994) yaitu gen *COI* (LCO1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') dan HCO2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti prosedur DNeasy Blood & Tissue kit (www.qiagen.com). DNA diamplifikasi menggunakan 5 x HOT Firepol Master Mix. Total volume yang digunakan untuk amplifikasi yaitu 25 μ l, yang terdiri atas 17 μ l ddH₂O, 5 μ l 5 x Hot Firepol Master Mix, 1 μ l DNA template dan 1 μ l volume dari tiap primer. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR *Tpersonal* (Biometra) dengan pengaturan suhu sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit dilakukan

sebanyak 30 siklus, annealing pada suhu 50°C sebanyak 30 siklus, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit sebanyak 30 siklus dan satu siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

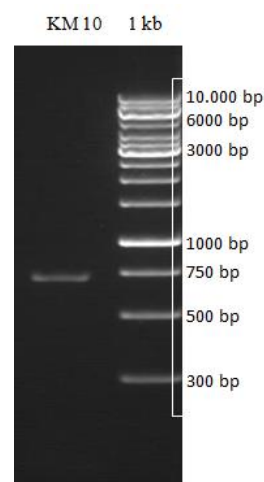
Proses sekuensing dilakukan dengan menggunakan metode Sanger. Metode Sanger yaitu suatu metode sekuensing DNA dengan prinsip penggunaan *dideoxyribonucleotide triphosphates* (ddNTPs) sebagai penghenti sintesis DNA pada posisi acak. Proses sekuensing menggunakan jasa perusahaan genetic yaitu *First base* Malaysia. Data DNA hasil sekuens gen *COI* kerang mutiara dalam bentuk kromatogram divisualisasikan menggunakan FinchTV untuk mengetahui kualitas sekuens dan dianalisis menggunakan MEGA versi 6 (Tamura *et al.* 2013). Urutan basa bagian awal dan akhir dihilangkan kurang lebih 50 bp dan pembacaan

nukleotida yang keliru diperbaiki berdasarkan tingkat keakuratan data. Hasil sekuensing yang menggunakan primer *reverse* dilakukan proses *reverse and complement* kemudian dipadukan dengan hasil sekuensing primer *forward*. Selanjutnya untuk mengetahui nama spesies kerang mutiara berdasarkan informasi urutan basa nukleotida dilakukan proses BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yaitu membandingkan dengan database sekuens DNA yang terdapat pada BOLD (*Barcode of Life Database*) yang dapat diakses di alamat www.boldsystems.org dan Bank gen NCBI dengan mengakses www.blast.ncbi.nlm.nih.gov.

Sekuen Bank gen yang paling mirip dicirikan dengan nilai *Max Score* dan *Total Score* sama, *Query Coverage* mendekati 100%, *E-value* mendekati 0, dan *Ident* mendekati 100% pada setiap database. Metode analisis filogenetik menggunakan metode Neighbour Joining (Saitou dan Nei 1987). Pengukuran jarak genetic menggunakan model substitusi nukleotida yaitu dengan membandingkan suatu sekuens DNA satu nukleotida dengan nukleotida yang lain (Kimura, 1980). Proses penjajaran (*alignment*) dilakukan dengan program CLUSTALW dengan tujuan untuk menentukan tingkat homologi dari urutan basa DNA yang dianalisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi gen *COI* pada Mollusca menggunakan primer universal sangat sulit dilakukan karena Mollusca menghasilkan protein mukopolisakarida dan protein polyphenolic yang *copurify* dengan DNA dan mengganggu proses enzimatik dari asam nukleotida (Winnepenninckx *et al.* 1993 dalam Pereira *et al.* 2011) sehingga diperlukan primer lainnya yang lebih spesifik pada setiap spesies. Gen *COI* yang berhasil teramplifikasi memiliki panjang sekitar 700 bp menggunakan 10.000 bp DNA ladder sebagai pembanding (Gambar 2).



Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi gen *COI* specimen kerang mutiara dalam 1% gel agarose (Keterangan: 1kb = DNA Ladder, KM 10 = Specimen Kerang mutiara).

```
ATAAAGATATTGGGACGTTATATCTCTTGTTAGGTCCTTGATCTGGAATAATTGGTACTGGGTTTAGTGTAATT
ATTCGGACTGAGTTGTGTCGTCCTGGCGCGAGGTATTTAGGGGATGGTCAGTTGTATAATAGGATTGTTACG
GCGCATGCTTTTATTATAATCTTTTTTTCGTGATGCCTATAATGATTGGTGGGTTTGGGAATTGATTAATTCC
AATGATGATGGGTGTTCCGGATATGGCTTTTCCTCGTCTCAATAATTGAGATTCTGACTTCTTCCTTCTTCTT
TATATTGTTTGTCTTGTGCGGCTTTTGTAGAGGGGGGGCGGCTACTGGGTGGACTGTGTATCCGCCTCTTT
CAACTTTTTTGTATCATGGTATATCTGTAGATTTGGCTATTTTTTCGCTTCATCTCGCTGGGCTTGCTTCAATT
ATGGGCGGGGATTAATTTTATCGTCACGGCTCAGAATATGCGGCGTATAGATAGTCATTTAATAGATTTGTTTC
CTTGAGCTGTGTTGGTTACTGCTGTGTTGCTTGTTGTGCTTTGCCTGTTTTAGCTGGTGGGATTACTATGCT
TTTAAGGGATCGTCACTTTAATACTAGATTTTATTTCCCGGCGGGGGAGGAGATCCTGTTTTGTTTCAGCAT
TTATTCTGATTTTTTGGTCACC
```

Gambar 3. Consensus DNA Kerang mutiara asal perairan Sulawesi Utara Specimen KM 10.

Amplifikasi gen *COI* dari kerang mutiara asal perairan Sulawesi Utara menghasilkan produk PCR dengan kualitas yang baik karena pita yang diperoleh dalam keadaan utuh tanpa adanya *smear* (Gambar 2). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh panjang DNA 681bp dan komposisi nukleotida specimen KM 10 yaitu Timin

berjumlah 284 (41,7%), Cytosin 103 (15,1%), Adenin 122 (17,9%) dan Guanin 172 (25,3%). Nilai kandungan basa nukleotida Timin merupakan yang terbanyak yaitu mencapai 41,7%.

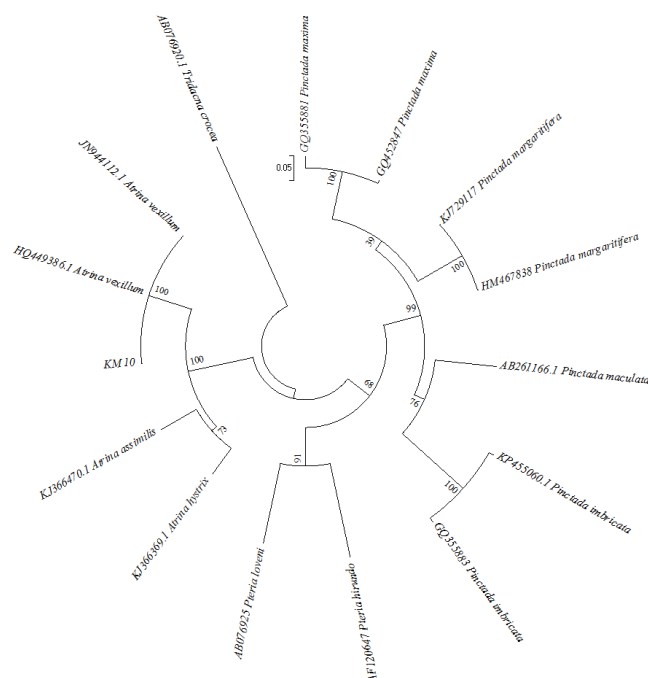
Tingkat kemiripan tertinggi dimiliki oleh spesies *Atrina vexillum* dengan *Max score* dan *total score* yang sama yaitu 1150, *query cover* 93%, *E-*

Tabel 1. Hasil BLASTING Specimen KM 10 di Bank gen NCBI (3 teratas).

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E-Value	Ident	Accession
<i>Atrina vexillum</i> Haplotype 1 COI partial cds; mitochondrial	1150	1150	93%	0	99%	JN944112.1
<i>Atrina vexillum</i> Haplotype 7 COI partial cds; mitochondrial	1122	1122	91%	0	99%	HQ449386.1
<i>Atrina vexillum</i> Haplotype 2 COI partial cds; mitochondrial	1119	1119	91%	0	99%	HQ449381.1

Tabel 2. Hasil pencarian specimen KM 10 di BOLD System (3 teratas).

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity	Status
Mollusca	Bivalvia	Pterioida	Pinnidae	<i>Atrina</i>	<i>vexillum</i>	95.69	Published
Mollusca	Bivalvia	Pterioida	Pinnidae	<i>Atrina</i>	<i>exusta</i>	95.59	Published
Mollusca	Bivalvia	Pterioida	Pinnidae	<i>Atrina</i>	<i>vexillum</i>	95.56	Published



Gambar 4. Rekonstruksi pohon filogenetik beberapa jenis bivalvia berdasarkan mtDNA gen *COI* menggunakan metode neighbor joining, model Kimura 2-parameter, dengan nilai bootstrap 1000 kali.

value 0.0 dan *Ident* 99%. *E-value* 0.0 yang diperoleh menunjukkan penjabaran yang signifikan yang berarti pencarian sekuens specimen penelitian ini identic yaitu dari genus yang sama bahkan sampai pada tingkat spesies yaitu dapat dipastikan specimen KM 10 merupakan spesies *Atrina vexillum* karena mempunyai nilai kemiripan sebesar 99% (Tabel 1).

Berdasarkan hasil pencarian dalam BOLD System dengan KM 10 sebagai pembandingan diperoleh data kemiripan sekuens. Tingkat persentase kemiripan tertinggi (*Similarity*) 95.69% yaitu pada spesies *Atrina vexillum* dengan taksonomi sebagai berikut: filum; Mollusca, Kelas; Bivalvia, Ordo; Pterioda, Famili; Pinnidae dan Genus; *Atrina* (Tabel 2).

Berdasarkan hasil analisis filogenetik molekuler menggunakan metode Neighbor joining diperoleh pohon filogenetik bentuk tidak berakar (*unroot*) (Gambar 4). Hasil analisis BLAST menunjukkan tingkat kemiripan KM 10 dengan spesies *Atrina vexillum* sebesar 99% dengan didukung oleh analisis filogenetik yang juga menunjukkan specimen KM 10 (Gambar 5) memang benar merupakan spesies *Atrina vexillum* karena berada dalam satu *clade* dengan *Atrina vexillum* (JN944112.1) dan *Atrina vexillum* (HQ449386.1) dengan nilai bootstrap 100%.



Gambar 5. Specimen KM 10 yang teridentifikasi sebagai spesies *Atrina vexillum* (Born, 1778)

Berdasarkan hasil penjabaran sekuens nukleotida gen *COI* spesies *Atrina vexillum* specimen KM 10

diperoleh situs mutasi *Atrina vexillum* yang berasal dari asal Sulawesi Utara dibandingkan dengan *Atrina vexillum* asal China. Situs mutasi tersebut merupakan basa nukleotida yang mengalami perubahan genetic berupa insersi, delesi dan transversi. Terdapat 63 situs nukleotida spesifik dari spesies *Atrina vexillum* yaitu terdiri atas 1 situs transversi yaitu pada situs nukleotida ke-172, situs nukleotida mutasi pada spesies yang terdiri dari 26 situs nukleotida yang mengalami insersi dan 36 situs nukleotida yang mengalami delesi.

Karakter automorfi spesies *Atrina vexillum* yaitu terdapat pada situs nukleotida ke-232 yaitu basa Adenin, situs nukleotida ke-235: Cytosin (C), situs nukleotida ke-268: Cytosin (C), situs nukleotida ke-404: Adenin (A) dan situs nukleotida ke-450: Timin (T).

KESIMPULAN

Karakter nukleotida gen *COI* berhasil diperoleh pada specimen KM 10 asal Arakan sebagai awal eksplorasi di Sulawesi Utara yakni diperoleh panjang DNA 681bp dan komposisi basa nukleotida Timin sebesar 284 (41,7%), Cytosin 103 (15,1%), Adenin 122 (17,9%) dan Guanin 172 (25,3%). Berdasarkan hasil penelitian diketahui specimen KM 10 merupakan spesies *Atrina vexillum*. Hasil analisis filogenetik menunjukkan spesies *Atrina vexillum* mempunyai kekerabatan yang dekat dengan *Atrina hystrix* dan *Atrina assimilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. 2007. *BOLD: The Barcode of Life Data System*. www.boldsystems.org.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. *DNA primers for amplification of*

- mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I diverse metazoan invertebrates*. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3(5), 294-299.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., de Waard, J. R. 2003. *Biological identification through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Science 270.313-322.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kumar, S., Filipski, A. J. 2001. *Molecular phylogeny reconstruction*. Encyclopedia of life science. Macmillan Publisher Ltd, Nature Publishing group. P.1-4.
- McCully, K. M. 2013. *Uncharted waters: bivalves of midway atoll and integrating mathematics into biology education*. Electronic theses and dissertations UC Santa Cruz.
- NCBI.1988. *NationalCenter for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. [Computer software]. www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Pereira, J. C., Chaves, R., Bastos, E., Leitao, A., Henrique, G. P. 2011. *An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species*. Int. J. Mol. Sci. 12. 8086-8095.
- Qiagen. 2006. *DNeasyBlood and Tissue Handbook: DNeasy Blood and Tissue Kit, DNeasy 96 Blood & Tissue Kit*. www.qiagen.com.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. *The neighbor-joining method- a new method for reconstructing phylogenetics trees*. [Computer software]. Mol. Biol. Evol. 4: 25-406.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. [Computer software]. Molecular Biology and Evolution. 30: 2725-2729.
- Yang, Z., Rannala, B. 2012. *Molecular phylogenetics: principles and practice*. Nature reviews genetics. Vol. 13. P. 303-314.